

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年7月26日 (26.07.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/53290 A1

(51)国際特許分類:
A61K 31/496, A61P 35/00

C07D 403/06,

仁戸田照彦 (NITODA, Teruhiko) [JP/JP], 赤澤和美 (AKAZAWA, Kazumi) [JP/JP]; 〒700-8530 岡山県岡山市津島中1-1-1 岡山大学農学部内 Okayama (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP00/06807

(74)代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22)国際出願日:

2000年9月29日 (29.09.2000)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:

特願2000-9370 2000年1月18日 (18.01.2000) JP

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 新日本製鐵株式会社 (NIPPON STEEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-8071 東京都千代田区大手町二丁目6番3号 Tokyo (JP). 新日鐵化学株式会社 (NIPPON STEEL CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒141-0031 東京都品川区西五反田7-21-11 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(71)出願人および

(72)発明者: 神崎 浩 (KANZAKI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒700-8530 岡山県岡山市津島中1-1-1 岡山大学農学部内 Okayama (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 加納周雄 (KANOHE, Kaneo) [JP/JP]; 〒293-8511 千葉県富津市新富20-1 新日本製鐵株式会社 技術開発本部内 Chiba (JP). 柳澤恵広 (YANAGISAWA, Satohiro) [JP/JP].

(54)Title: CELL DIVISION INHIBITORS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54)発明の名称: 細胞分裂阻害剤及びその製造方法

WO 01/53290 A1

(57)Abstract: Cell division inhibitors containing as the active ingredient various dehydrodiketopiperazines such as dehydropheniramine or analogs thereof and dehydrogenases and a process for producing the same.

(57)要約:

本発明は、デヒドロフェニラヒスチジンをはじめとする種々のデヒドロジケトピペラジン類又はその類縁体を活性成分として含有する細胞分裂阻害剤、並びにこれらを製造するための脱水素酵素及び方法に関する。

明細書

細胞分裂阻害剤及びその製造方法

技術分野

本発明は、細胞分裂阻害剤（細胞周期阻害剤）及び抗腫瘍剤並びに酵素を用いたそれらの製造方法に関する。

背景技術

人体を構成する細胞は恒常性を維持するためにその増殖と分化は厳密に制御されている。細胞は、M期・G1期・S期・G2期という一連の過程からなる細胞周期を回転することにより分裂、増殖を行う。この細胞周期の制御機構に異常が生じると癌や免疫疾患になる。

最近では、細胞周期の調節機構が分子レベルで解明されつつあり、細胞周期を調節する物質には、抗腫瘍剤、免疫抑制剤の可能性が知られている。そして、近年パクリタキセル、ビンクリスチン、ビンプラスチンのように、細胞骨格蛋白質の一つで細胞分裂の際に複製された遺伝子の娘細胞への正確な分配に中心的な役割を果たすチューブリンの機能を阻害する物質が、抗腫瘍剤として、あるいは抗腫瘍剤のリード化合物として注目をあびている。

福島らは、アルボノルシン(albonoursin)が抗腫瘍活性及び抗菌活性があることを見出し(Fukushima et al., J. Antibiotics, Vol. 26, pp. 175, 1973)、小林らは、アルボノルシンに雌核雄核融合阻害作用があることを見出している(小林他、天然有機化合物討論会講演要旨集第51頁、1989年)。また、神崎らは、テトラデヒドロシクロ(Phe-Phe)が、ウニ胚分裂阻害活性を示すことを見出している(日本放線菌学会講演要旨集第42頁、1999年)。

加納らは神奈川県内の土壤より分離した糸状菌Aspergillus ustus NSC-F037株及び同NSC-F038株が新規抗腫瘍物質フェニラヒスチンを生産することを発見し、この物質の構造決定を行った。フェニラヒスチンは分子内に不斉炭素原子を有し、詳細な解析の結果、本生産菌の生産するフェニラヒスチンは(-)-フェニラヒスチ

ンと(+) -フェニラヒスチニの混合物であり、(-) -フェニラヒスチニの抗腫瘍活性が(+) -体の約30~100倍強力であることを発見している(特開平10-130266号公報; Kanoh et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 7, No. 22, pp. 2847-2852, 1997; Kanoh et al., Bioscience Biotechnology Biochemistry, Vol. 63, No. 6, pp. 1130-1133, 1999)。そして、(-) -フェニラヒスチニがチューブリンの重合を阻害することを明らかにしている(Kanoh et al., The Journal of Antibiotics, Vol. 52, No. 2, pp. 134-141, 1999)。また、癌細胞を移植したモデル動物を用い(-) -フェニラヒスチニの抗腫瘍効果を検討し、(-) -フェニラヒスチニがある程度の抗腫瘍活性を有することを示した(Kanoh et al., Bioscience Biotechnology Biochemistry, Vol. 63, No. 6, pp. 1130-1133, 1999)。しかし、臨床上の立場からは、(-) -フェニラヒスチニの抗腫瘍効果よりも更に強力な抗腫瘍活性を有する薬剤が望まれている。

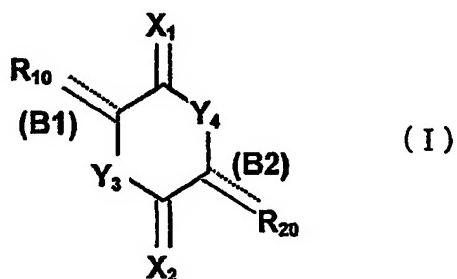
発明の開示

本発明は、より強力な細胞周期阻害活性、特に抗腫瘍活性を有する細胞分裂阻害剤、及び酵素を用いたその製造方法の提供を目的とする。

本発明者は前記課題の解決のために銳意検討した結果、デヒドロフェニラヒスチニをはじめとする種々のデヒドロジケトビペラジン類又はその類縁体が(-) -フェニラヒスチニより強力な細胞周期阻害活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 次式(I) :



[式中、X₁及びX₂は、それぞれ独立に酸素原子又は硫黄原子を表し、

Y_3 は酸素原子、硫黄原子、 $-NR_3-$ 又は $-CR_{31}R_{32}-$ を表し、

Y_4 は酸素原子、硫黄原子、 $-NR_4-$ 又は $-CR_{41}R_{42}-$ を表し、

R_{10} はハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R_{20} はハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R_3 及び R_4 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R_{31} 、 R_{32} 、 R_{41} 及び R_{42} は、それぞれ独立に、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

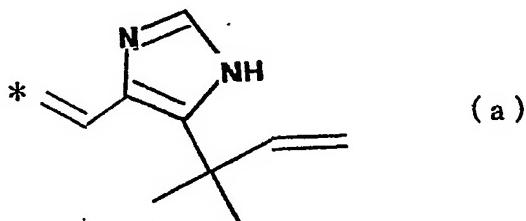
R_{10} と R_3 、 R_{31} 、 R_{32} のいずれかとは環を形成していてもよく、

R_{20} と R_4 、 R_{41} 及び R_{42} のいずれかとは環を形成していてもよく、

(B1) 及び (B2) は、それぞれ独立に炭素-炭素一重結合又は炭素-炭素二重結合を表し、少なくとも一方は炭素-炭素二重結合であり、その立体配置はE, Zのいずれでもよく、

前記の基の少なくとも1つは、生体において分解可能な保護基を有していてよい。但し、 X_1 及び X_2 が共に酸素原子で、 Y_3 及び Y_4 が共に $-NH-$ で、 R_{10} がベンジル基で、(B1) 及び (B2) が共に炭素-炭素二重結合であり、かつ、 R_{20} がイソブチル基又はベンジル基である場合、並びに X_1 及び X_2 が共に酸素原子で、 Y_3 及び Y_4 が

共に $-NH-$ で、 R_{10} がベンジル基で、(B1)が炭素-炭素一重結合で、(B2)が炭素-炭素Z-二重結合であり、かつ、 R_{20} が次式(a)：



(式中、*は結合位置を表す。)

で示される基である場合を除く。]

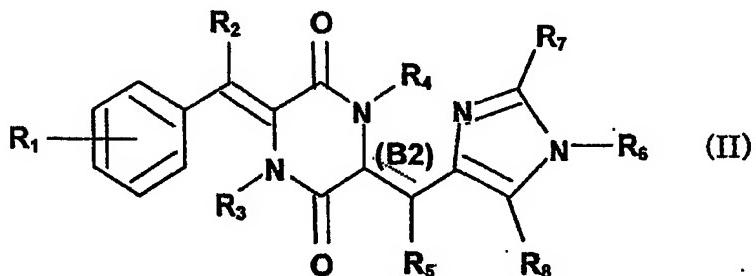
で示される化合物又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有する細胞分裂阻害剤。

(2) 前記式(I)において、(B1)及び(B2)が共に炭素-炭素二重結合である前記(1)に記載の細胞分裂阻害剤。

(3) 前記式(I)において、 X_1 及び X_2 が共に酸素原子で、 Y_3 が $-NR_3-$ 、 Y_4 が $-NR_4-$ である前記(1)又は(2)に記載の細胞分裂阻害剤。

(4) 前記式(I)において、 Y_3 及び Y_4 は共に $-NH-$ である前記(3)に記載の細胞分裂阻害剤。

(5) 次式(II)：



(式中、 R_1 は水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んで

いてもよく、R₁は1個でも、同一又は異なる5以下の複数個でもよく、互いに環を形成してもよく、

R₂は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₃及びR₄は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₅は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₆は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₇及びR₈は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₂とR₃とは環を形成していてもよく、

R₄とR₅、R₆、R₇及びR₈のいずれかとは環を形成していてもよく、

(B2) は炭素-炭素一重結合又は炭素-炭素二重結合を表し、
前記の基の少なくとも1つは、生体において分解可能な保護基を有していてよい。)

もしくはこのE体で示される化合物又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有する細胞分裂阻害剤。

(6) 前記式(II)において、(B2)が炭素-炭素二重結合である前記(5)に記載の細胞分裂阻害剤。

(7) 前記式(II)において、R₇及びR₈の少なくとも一方が1, 1-ジメチル-2-プロペニル基である前記(6)に記載の細胞分裂阻害剤。

(8) 抗腫瘍剤である前記(1)～(7)のいずれかに記載の細胞分裂阻害剤。

(9) 前記式(I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素-炭素一重結合である化合物、又は前記式(II)における(B2)が炭素-炭素一重結合である化合物の当該炭素-炭素一重結合を炭素-炭素二重結合に変換する活性を有する脱水素酵素。

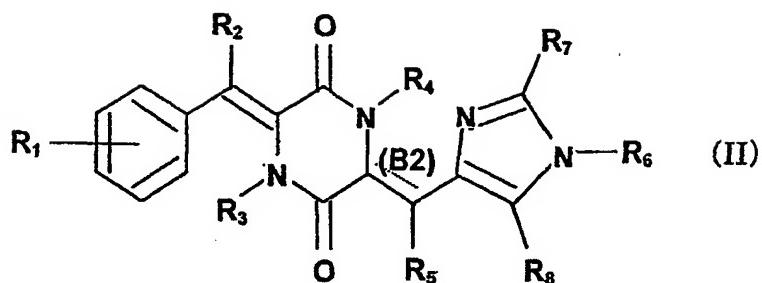
(10) 分子量が700kDaから800kDaである前記(9)に記載の脱水素酵素。

(11) *Streptomyces albulus*が生産する前記(9)又は(10)に記載の酵素。

(12) 前記式(I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素-炭素一重結合である化合物、又は前記式(II)における(B2)が炭素-炭素一重結合である化合物を基質として用い、前記(9)～(11)のいずれかに記載の脱水素酵素を含む細胞、無細胞抽出液又は酵素液を用いて、当該炭素-炭素一重結合を炭素-炭素二重結合に変換することを含む前記(1)～(8)のいずれかに記載の細胞分裂阻害剤の製造方法。

(13) 前記(11)に記載の脱水素酵素を用いた前記(12)に記載の方法。

(14) 次式(II)：



(式中、R₁は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、R₁は1個でも、同一又は異なる5以下の複数個でもよく、互いに環を形成してもよく、

R₂は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₃及びR₄は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₅は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₆は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリ

ール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R_7 及び R_8 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R_2 と R_3 とは環を形成していてもよく、

R_4 と R_5 、 R_6 、 R_7 及び R_8 のいずれかとは環を形成していてもよく、

(B2)は炭素-炭素一重結合又は炭素-炭素二重結合を表し、

前記の基の少なくとも1つは、生体において分解可能な保護基を有していてよい。)

もしくはこのE体で示される化合物又はその薬学的に許容される塩。

以下、本発明について詳細に説明する。

まず、本発明の範囲内に含まれる種々の定義の適当な例と説明を以下に述べる。

前記式(I)及び(II)において“ハロゲン原子”という用語は特に指示がなければ、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素を意味する。

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{20} 、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{41} 又は R_{42} で表される C_{1-25} アルキル基は、炭素原子1～25を有するアルキル基であり、直鎖状、分枝状又は環状のいずれでもよく、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシル、ヘプチル、5-メチルヘキシル、シクロヘプチル、オクチル、6-メチルヘプチル、ノニル、7-メチルオクチル、デシル、8-メチルノニルが挙げられ、好ましくは C_{1-10} アルキルであり、更に好ましくは C_{1-6} アルキルである。これらのアルキル基は他の置換基により置換されていてもよく、ハロゲン、酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい。

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{20} 、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{41} 又は R_{42} で表される C_{2-25} アルケニル基は、炭素原子2～25を有するアルケニル基であり、直鎖状、分枝状又

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{20} 、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{41} 又は R_{42} で表されるアラルキル基は、前記アリール基で置換された C_{1-6} アルキルであり、例えばベンジル、フェネチル、ナフチルメチル、アントラニルメチルが挙げられ、好ましくはベンジルである。これらのアラルキル基は他の置換基、例えば C_{1-6} アルキル（好ましくはメチル、エチル、プロピル）、 C_{1-6} アルコキシ、ハロゲン、ニトロ、アミノ、カルボキシル、ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル、ヒドロキシ、保護されたヒドロキシにより置換されていてもよく、環員として酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい。

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{20} 、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{41} 又は R_{42} で表される置換アミノ基における置換基としては、例えば C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、ハロゲン、カルボキシル、ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル、ヒドロキシ、保護されたヒドロキシが挙げられる。

前記式(I)において、 R_{10} と R_3 、 R_{31} 、 R_{32} のいずれかとは環を形成していてもよく、 R_{20} と R_4 、 R_{41} 及び R_{42} のいずれかとは環を形成していてもよく、前記式(II)において、 R_2 と R_3 とは環を形成していてもよく、 R_4 と R_5 、 R_6 、 R_7 及び R_8 のいずれかとは環を形成していてもよい。

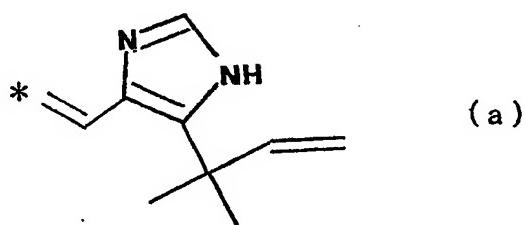
なお、 R_7 又は R_8 で表される C_{2-25} アルケニル基としては、炭素原子5個よりなるイソプレン単位に相当するアルケニル基、即ち1,1-ジメチル-2-プロペニル、3-メチル-3-ブテン基、及びこれらのイソプレン単位に相当するアルケニル基が複数個、好ましくは3個までのユニットとして（炭素原子数15まで）結合したものが好ましい。

前記式(I)及び(II)中の置換基は、生体において分解可能な保護基を有していてもよい。このような保護基のうち、例えば、アミノ基の保護基としては、具体的には、「医薬品の開発」第13巻、「薬物送達法」（瀬崎仁編集、広川書店、平成元年7月発行）116頁の表2.29に記載されているような酸アミド、カルバメート等の結合様式を有する保護基であればよく、アセチル基等の脂肪酸由来のアシリル基が好ましい。

前記式(I)又は(II)で示される化合物の二重結合は、いずれもZ配置でもE配置でもよいが、Z配置であることが好ましい。

なお、(B1)及び/又は(B2)が炭素-炭素二重結合である場合、当該炭素-炭素二重結合に結合する前記の置換基は、対応する2価の基となる。例えば、メチル基はメチレン基、ベンジル基はフェニルメチレン(ベンジリデン)基となる。

前記式(I)で示される化合物のうち、X₁及びX₂が共に酸素原子で、Y₃及びY₄が共に-NH-で、R₁₀がベンジル基で、(B1)及び(B2)が共に炭素-炭素二重結合であり、かつ、R₂₀がイソブチル基である化合物(一般名:アルボノルシン、化合物名:3-(Z)-ベンジリデン-6-(Z)-イソブチリデン-2,5-ピペラジンジオン)は、Fukushima et al., J. Antibiotics, Vol. 26, pp. 175, 1973)に記載されている公知の抗腫瘍剤、及び天然有機化合物討論会講演要旨集第51頁、1989年に記載されている公知の雌核雄核融合阻害剤であり、本発明の細胞分裂阻害剤は、これを除くものである。また、X₁及びX₂が共に酸素原子で、Y₃及びY₄が共に-NH-で、R₁₀及びR₂₀が共にベンジル基で、(B1)及び(B2)が共に炭素-炭素二重結合である化合物(テトラデヒドロシクロ(Phe-Phe))は、日本放線菌学会講演要旨集第42頁、1999年に記載されている公知のウニ胚分裂阻害剤であり、本発明の細胞分裂阻害剤は、これを除くものである。また、X₁及びX₂が共に酸素原子で、Y₃及びY₄が共に-NH-で、R₁₀がベンジル基で、(B1)が炭素-炭素一重結合で、(B2)が炭素-炭素Z-二重結合であり、かつ、R₂₀が次式(a):



(式中、*は結合位置を表す。)

で示される基である化合物(一般名:フェニラヒスチン、化合物名:3-[5-(1,1-ジメチル-2-プロペニル)イミダゾール-4-イル]メチレン]-6-ベンジルピペラジン-2,5-ジオン)は、特開平10-130266号公報等に記載されている公知の細胞分裂阻害剤であり、本発明の細胞分裂阻害剤は、これ

を除くものである。また、本発明の細胞分裂阻害剤としては、通常、前記式(I)において、 X_1 及び X_2 が、それぞれ独立に、酸素原子又は硫黄原子で、 Y_3 が $-NR_3-$ 、 Y_4 が $-NR_4-$ （ここで、 R_3 及び R_4 は前記と同義である。）で、 R_{10} が置換又は非置換のベンジル基で、(B1)が炭素-炭素一重結合で、(B2)が炭素-炭素Z-二重結合であり、かつ、 R_{20} が置換又は非置換のイミダゾール-4-イルメチレンである化合物以外のものが用いられる。

また、前記式(I)において、(B1)が炭素-炭素二重結合で、(B2)が炭素-炭素一重結合又は炭素-炭素二重結合であるものが好ましく、(B1)及び(B2)が共に炭素-炭素二重結合であるものが更に好ましい。

前記式(I)又は(II)で示される化合物の好ましい例は、3-(イミダゾール-4-イルメチレン)-6-(フェニルメチレン)ピペラジン-2,5-ジオン、3-[(5-メチルイミダゾール-4-イル) メチレン] -6-(フェニルメチレン)ピペラジン-2,5-ジオン、

3-[(5-エチルイミダゾール-4-イル) メチレン] -6-(フェニルメチレン)ピペラジン-2,5-ジオン、

3-[(5-ブチルイミダゾール-4-イル) メチレン] -6-(フェニルメチレン)ピペラジン-2,5-ジオン、

3-[(5-ベンチルイミダゾール-4-イル) メチレン] -6-(フェニルメチレン)ピペラジン-2,5-ジオン、

3-{ [5-(1,1-ジメチル-2-プロペニル)イミダゾール-4-イル] メチレン} -6-(フェニルメチレン)ピペラジン-2,5-ジオンである。

前記式(I)又は(II)で示される化合物の薬学的に許容される塩は、通常の有機又は無機の無毒性塩類であり、当該化合物が塩基性物質である場合には、好ましくは塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸塩として用いられ、当該化合物が酸性物質である場合には、好ましくは無機塩基との塩、例えばアルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）として用いられる。本明細書において「薬学的に許容される」とは、医薬、獣医薬、農薬、殺菌剤、殺虫剤等の他、研究用試薬も含める分野において許容される意味

である。

本発明の細胞分裂阻害剤は、原核又は真核生物の細胞分裂、細胞周期及び雌核雄核融合を阻害するような目的に用いることができる。具体的には、殺菌剤、農薬、獣医薬、殺虫剤、医薬品、研究用試薬として有用である。更に医薬品の中でも、特に抗腫瘍剤として有用である。本発明の細胞分裂阻害剤は、無秩序に細胞分裂を繰り返すような病態に対して有効である。特に癌に対して有用で、またある種の自己免疫疾患、慢性関節リューマチ等ある種の細胞が無秩序に増殖を続けるに至った病態に対しても有効である。

更に本発明の抗腫瘍剤は種々の疾患の治療において、前記活性成分の他に、必要に応じて他の医薬として有効な成分、例えば他の抗腫瘍剤を含有させることもできる。顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤又はカプセル剤の形態をとる場合には、前記活性成分を5～80重量%含有させるのが好ましい。液剤の場合には、前記活性成分を1～30重量%の割合で含有させるのが好ましい。更に、非経口投与剤のうち注射剤として用いる場合には、前記活性成分を1～10重量%の割合で含有させるのが好ましい。

臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し前記活性成分として、1日当たり0.1 mg～1 gを内服するのが好ましい。しかしながら、患者の年齢、体重、症状等によって適宜投与量を増減させることもできる。前記の本発明の抗腫瘍剤は、1日1回投与も可能であるが、適当な間隔をおいて2～3回にわけて投与することもできる。更に、注射剤として用いる場合には、前記活性成分として成人に対し1回量1～数百mgを投与するのが望ましい。また、その投与は注射による1日1～3回の、又は2～3日に1回の投与、あるいは点滴等による持続投与で行うことが可能である。

本発明の脱水素酵素は、前記式(I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素-炭素一重結合である化合物、又は前記式(II)における(B2)が炭素-炭素一重結合である化合物を基質とすることができるが、好ましくは、前記式(I)において、X₁及びX₂が共に酸素原子で、Y₃が-NR₃-、Y₄が-NR₄-（ここで、R₃及びR₄は前記と同義である。）である化合物、更に好ましくは前記式(I)において、X₁及びX₂が共に酸素原子で、Y₃及びY₄は共に-NH-である化

合物を基質とし、特に好ましくはL体のアミノ酸2つが縮合してジケトピペラジン環を形成した環状ジペプチド又はその置換体を基質とする。前記縮合するアミノ酸としては、好ましくはフェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、チロシン等の環状（芳香族）アミノ酸が挙げられる。前記環状ジペプチドの置換体における置換基としては、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基、アリール基が挙げられ、これらの基は、他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、互いに環を形成していてもよく、生体において分解可能な保護基を有していてもよく、好ましくは炭素数2～6のアルキル基又はアルケニル基、更に好ましくは1, 1-ジメチル-2-プロペニル基が挙げられる。

なお、前記の基質として用いる化合物の多くは公知の化合物であり（特開平10-130266号公報；Kanoh et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 7, No. 22, pp. 2847-2852, 1997；Kanoh et al., Bioscience Biotechnology Biochemistry, Vol. 63, No. 6, pp. 1130-1133, 1999；Kanoh et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 7, pp. 1451-1457, 1999）、これらを用いることができる。また、その他の化合物は、Kopple et al., The Journal of Organic Chemistry, Vol. 33, pp. 862-864, 1968又はNitecki et al., The Journal of Organic Chemistry, Vol. 33, pp. 864-866, 1968に記載の方法と同様にして製造することができる。

本発明の脱水素酵素は、種々の分子量のものが存在するが、分子量が700kDaから800kDaであるものが好ましい。

本発明の脱水素酵素は、補酵素としてニコチンアデニンジヌクレオチド(NAD)、ニコチンアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)、フラビンモノヌクレオチド(FMN)、ピロロキノリンキノン(PQQ)、チトクローム類等の天然物の他、ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)、フェナジンメトサルフェート(PMS)、フェリシアン化物、テトラメチルフェニレンジアミン、キノン類等の合成化合物等を用いることができるが、FMN、PQQ、チトクローム類、DCIP、PMS、フェリシアン化物、テトラメチルフェニレンジアミ

ン、キノン類が好ましく、DCIP及び／又はPMSが特に好ましい。

本発明の脱水素酵素は、如何なる生物から得られたものでもよいが、好ましくは細菌、放線菌、糸状菌等の微生物由来、更に好ましくは放線菌由来、特に *Streptomyces albulus* 由来のものが好ましい。

Streptomyces albulus 由来の脱水素酵素は、以下に示す理化学的性質を有する。

(i) 作用

3位又は6位に存在する炭素－炭素一重結合を炭素－炭素二重結合に変換する活性を有する。

(ii) 基質特異性

フェニラヒスチンをデヒドロフェニラヒスチンに変換し、シクロフェニルアラニルヒスチジルをデヒドロ又はテトラデヒドロシクロフェニルアラニルヒスチジルに変換する。

(iii) 至適pH 8.3

(iv) pH安定性 7.0～9.0で安定

(v) 至適温度 60℃

(vi) 熱安定性 20～70℃で安定、80℃で失活

(vii) 分子量 700kDaから800kDa

本発明の脱水素酵素の使用形態は、組織あるいは細胞のままでもよく、無細胞抽出液、あるいはこれを部分精製あるいは完全に精製した酵素液でもよい。精製方法は、一般的な酵素精製方法に従えばよい。また、他の酵素を混合して多段階反応を一度に行ってもよい。

本発明の脱水素酵素を用いることにより、前記式(I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素－炭素一重結合である化合物、又は前記式(II)における(B2)が炭素－炭素一重結合である化合物を基質として用いて、前記式(I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素－炭素二重結合である化合物、又は前記式(II)における(B2)が炭素－炭素二重結合である化合物を製造することができ、これらは細胞分裂阻害剤又は抗腫瘍剤として有用である。

以下、本発明を、例を挙げて詳細に説明する。

本発明の細胞分裂阻害剤の活性成分は前記式(I)における(B1)及び(B2)の少

なくとも一方が炭素-炭素二重結合である物質であるが、代表的なものとして置換又は非置換デヒドロジケトピペラジン類、置換又は非置換テトラデヒドロジケトピペラジン類、置換又は非置換デヒドロ環状ジペプチド、置換又は非置換テトラデヒドロ環状ジペプチド、特に前記式(II)で示される置換又は非置換デヒドロあるいはテトラデヒドロシクロフェニルアラニルヒスチジル、ことにデヒドロフェニラヒスチンを挙げることができる。

以下に、デヒドロフェニラヒスチンを例に取り、その製造法について述べるが、本発明の態様が本例に限らないことはいうまでもない。

放線菌、例えば*Streptomyces albulus* K023株（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology)に受託番号 FERM BP-6994として平成12年1月14日付で寄託されている。）を培養し、当該培養物から脱水素酵素を調製し、フェニラヒスチンに作用させ、新規化合物デヒドロフェニラヒスチンを採取する方法は、具体的には後述する実施例にも記載するが、酵素を精製して用いてもよいし、菌体抽出液をそのまま用いてもよい。その脱水素酵素の調製に当たっては、概ねストレプトマイセス属に属する放線菌の培養方法に従って実施することができる。培養終了後、培養液から本発明の脱水素酵素を精製、もしくは、本酵素活性を含有する菌体抽出液を調製するには、一般に微生物由来酵素を精製するのに通常用いられる手段を適宜利用することができる。例えば、超音波破碎、遠心分離、塩析、透析、各種イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂、ゲル濾過クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィー、或いは結晶化、凍結乾燥等の手段をそれぞれ単独又は適宜組み合わせて、或いは反復して使用することが可能である。

また、前記のように調製した酵素液もしくは菌体抽出液を用いて脱水素反応を行う方法は具体的には後述する実施例にも記載するが、リン酸緩衝液等の緩衝液中、酵素溶液とその基質であるフェニラヒスチンを混合し反応を行う。必要であれば、有機溶媒を反応液中に加えることも可能である。

前記反応液からデヒドロフェニラヒスチンを精製、単離するには、一般に有機

化合物の単離・精製に通常用いられる手段を適宜利用することができる。例えば、各種イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂、ゲル濾過クロマトグラフィー、又は活性炭、アルミナ、シリカゲル等の吸着剤によるクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィー、或いは結晶化、減圧濃縮、凍結乾燥等の手段をそれぞれ単独又は適宜組み合わせて、或いは反復して使用することが可能である。

以上のようにして製造されるデヒドロフェニラヒスチンは、後述の実施例に示すように細胞分裂阻害活性を有する。デヒドロフェニラヒスチンを活性成分とする本発明の細胞分裂阻害剤は、その使用目的に合わせて、使用方法、剤形、投与量（使用量）が適宜決定される。例えば、デヒドロフェニラヒスチンを活性成分とする本発明の抗腫瘍剤の場合、その投与形態は、経口投与でも非経口投与でもよい。剤形としては、例えば錠剤、散剤、カプセル剤、顆粒剤、エキス剤、シロップ剤等の経口投与剤又は注射剤もしくは坐剤等の非経口投与剤を挙げができる。これらの製剤は、賦形剤、結合剤等の薬学的に許容される添加剤を用いて、既知の方法で製造される。また、前記のデヒドロフェニラヒスチンを活性成分として含有する抗腫瘍剤の臨床的投与量は、患者の年齢、体重、感受性、症状の程度により異なるが、通常効果的な量は、成人一日 0.1 mg ~ 1 g 程度であり、一日一回又は数回にわけて投与することも可能である。また、必要により前記の範囲外の量を用いることもできる。

また、生化学試験用試薬として使用する場合、有機溶剤又は含水有機溶剤に溶解して各種培養細胞系へ直接投与すると、細胞周期の進行を G₂ / M 期で阻止する。使用可能な有機溶剤としては、例えば、メタノールやジメチルスルホキシド等を挙げができる。剤形としては、例えば、粉末、顆粒等の固形剤もしくは有機溶剤又は含水有機溶剤に溶解した液剤等を挙げができる。通常前記デヒドロフェニラヒスチンを活性成分とする細胞分裂阻害剤の効果的な使用量範囲は 0.01 ~ 100 μg/mL であるが、適切な使用量は培養細胞系の種類や使用目的により異なる。また、必要により前記の範囲外の量を用いることもできる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2000-9370 号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例等を記載して本発明を具体的に記載する。なお、以下cyclo(A₁-A₂) (A₁及びA₂のアミノ酸2つが縮合してジケトピペラジン環を形成した環状ジペプチド) をCA₁A₂ (A₁及びA₂はそれぞれアミノ酸1文字表記) と表記し、特記しない限り全てL体を示し、必要に応じてD体をDA₁等と表記する。また、デヒドロ体は△で表し、C△A₁A₂はcyclo(△A₁-A₂)、CA₁△A₂はcyclo(A₁-△A₂)、C△A₁△A₂はcyclo(△A₁-△A₂)、△CA₁A₂はC△A₁A₂、CA₁△A₂及びC△A₁△A₂の混合物を表す。また、PLHはフェニラヒスチンを示す。

(実施例1)

(1) フェニラヒスチンの製造を以下のように行った。

グルコース0.5%、グリセリン2%、酵母エキストラクト0.2%、ファーマメディア（綿実かす）2%、塩化ナトリウム0.25%及び寒天1.5%（pH 6.5）からなる固体培地（直径9cmシャーレに20mLの前記培地）にフェニラヒスチン生産菌（Aspergillus ustus NSC-F038株（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology）に受託番号FERM P-15830として平成8年9月3日付で寄託されている。））を5点接種し26℃で7日間、暗所にて培養を行い、胞子懸濁液を得た。この胞子懸濁液を前記固体培地20mLを含むシャーレ400枚に0.1mLずつ接種し、26℃で8日間、暗所にて培養を行った。この培養物をミキサーにて破碎し、8Lの酢酸エチルを加え、2日間放置し、抽出した。回収した酢酸エチル層を減圧濃縮し、褐色のシロップ15gを得た。このシロップを20mLの酢酸エチルに溶解し、アセトン-酢酸エチル（1:6）で調製したシリカゲルカラム（直径8cm、長さ20cm）に浸潤させ、アセトン-酢酸エチル（1:6）にて溶出を行った。溶出液を500mLずつを溶出順に従って分画した。フェニラヒスチンは5~10番目の分画に溶出され、この溶出物を減圧濃縮することにより計4.7gの濃茶色粉末を得た。この濃茶色粉末を10mLのクロロホルムにて溶解し、クロロホルムで調製したシリカゲルカラム（直径4cm、長さ30cm）に浸潤させ、最初にクロロホルム500mLで溶出し、次にクロロホルム-メタノール（50:1）にて溶出した。

本化合物は、クロロホルム-メタノール（50：1）溶液にて溶出され、計1.05 gの茶色粉末を得た。この茶色粉末に酢酸エチル100 mLを加え、よく攪拌し2日間静置することにより、フェニラヒスチンを白色粉末628 mgとして析出させた。

(2) *Streptomyces albulus* K023株の培養及び無細胞抽出液の調製は以下のように行った。

灰色の胞子が十分に形成されたスラントに、界面活性剤 (Triton X-100) 50~200 μLを含む滅菌水10 mLを加え、懸濁したものを胞子懸濁液とした。これを培地量の1/1000量添加し、以下の条件で培養を行った。培地組成を表1に示す。

表 1

KP培地組成 (g/L)

glucose	15
glycerol	10
polypepton	10
beef extract	10
CaCO ₃	4

pH 7.3

培養条件を表2に示す。

表 2

培養条件

・前培養 (200 mL三角フラスコ)

KP培地 40 mL

培養時間 24時間

回転数 180回転/min

温度 28 °C

・本培養 (5 L容のジャーファーメンター)

KP培地 3 L

消泡剤 (Antiform AFIエマルジョン) 10 g/ 3 L

培養時間 48時間

回転数 300 回転 / min

通気量 2 L / 3 min

温度 28 °C

無細胞抽出液の調製は以下のように行った。

培養液40 mLを遠心分離 (20,000×g, 15 min, 4 °C) し、菌体を得た。この菌体を生理食塩水40 mLに懸濁し、再度遠心分離 (20,000×g, 15 min, 4 °C) を行い菌体を洗浄した。この菌体をリン酸ナトリウム緩衝液 (10 mM, pH 8.0) 7.3 mLに懸濁し、超音波破碎 (150W, 1.5 min, KUBOTA INSONATOR 201M) を行った。この溶液を遠心分離 (20,000×g, 15 min, 4°C) した上清をもって無細胞抽出液とした。

(3) フェニラヒスチジンのデヒドロフェニラヒスチジンへの変換反応、及び反応生成物の精製は以下のように行った。

反応液組成を表3に示す。

表 3

反応液組成

フェニラヒスチジン	0.5 mg/mL
ジメチルスルホキシド	10 % (v/v)
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)	9 mM
無細胞抽出液	0.145 units/mL
温度	50 °C

前記反応液100 mLを20 mLずつ200 mL三角フラスコに分注し、160ストローク/分、24時間反応を行った。反応後、遠心分離 (20,000×g, 15 min, 4 °C) により、黄色沈殿を得た。この沈殿を55 mLのメタノールに溶解し、再度遠心分離 (20,000×g, 15 min, 4 °C) を行った。得られた上清を減圧乾固し、メタノールから再結晶を行うことによってデヒドロフェニラヒスチジンの黄色針状結晶5.58 mgを得た。

デヒドロフェニラヒスチジンの物理化学データを以下に示す。

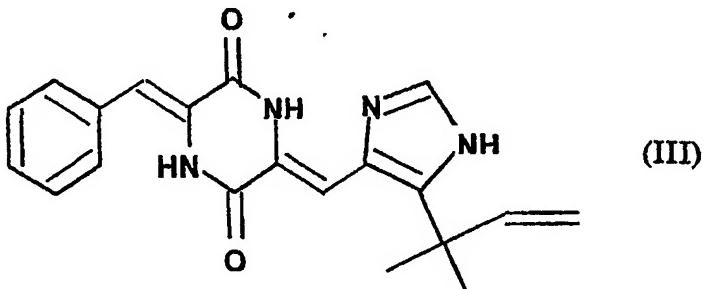
EIMS m/z: 348 (M⁺, 100), 133 (25), 160 (17), 260 (16).

UV (MeOH) λ_{max}, nm (ε): 205 (16600), 363 (35300)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ 1.51, 6H, s
 δ 5.16, 1H, d ($J=17.4$)
 δ 5.20, 1H, d ($J=10.7$)
 δ 6.03, 1H, dd ($J=10.7, 17.4$)
 δ 6.96, 1H, s
 δ 6.98, 1H, s
 δ 7.32, 1H, d ($J=7.0$)
 δ 7.37, 2H, d ($J=7.3$)
 δ 7.43, 2H, dd ($J=7.0, 7.3$)
 δ 7.57, 1H, s
 δ 8.04, 1H, s
 δ 9.06, 1H, br s
 δ 12.23, 1H, s

また、ジケトビペラジンのプロトン (δ 8.04, 1H, s) とフェニル基のプロトン (δ 7.43, 2H, dd ($J=7.0, 7.3$))との間にNOEが観測されたことから本化合物を(Z,Z)-dehydorphenylahistinと決定した。その構造式を式(III)として示す。



(実施例 2)

シクロフェニルアラニルヒスチジル(CFH)の脱水素反応によるデヒドロ体の製造を以下のように行った。

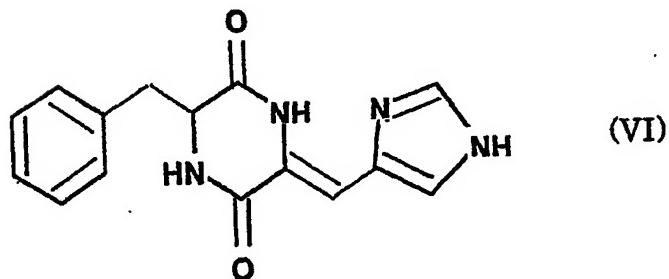
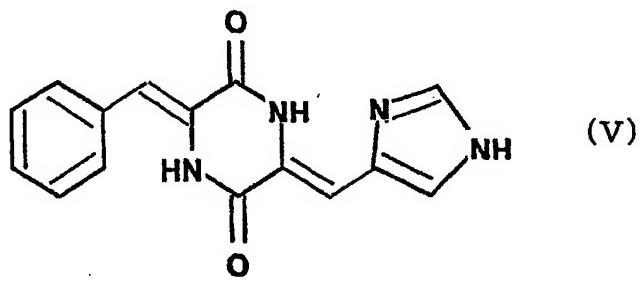
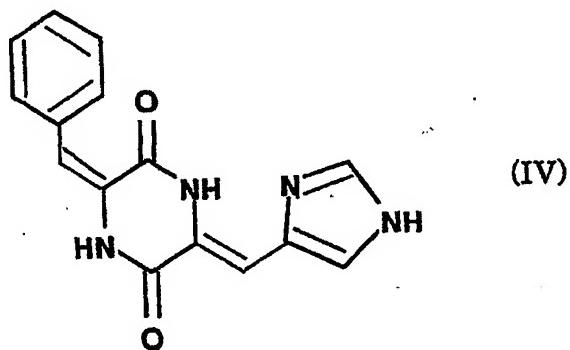
表 4

反応液組成

CFH	0.5 mg/mL
ジメチルスルホキシド	10 % (v/v)
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)	9 mM

無細胞抽出液（実施例1にて記述したもの） 0.435 unit/mL

表4に示す組成の反応液100 mLを作成し、5本の20 mL三角フラスコに分注し、レシプローカル（160 strokes/min）、50 °C、24時間反応を行った。24時間後、反応液を遠心分離（4 °C、20,000×g、15分）し、上清を得た。この上清を酢酸エチルで抽出、高速液体クロマトグラフィーによる精製（精製条件：Waters 600 Controller, 486 Tunable Absorbance Detector, 616 Pump, カラム Inertsil ODS-3 直径20 mm×250 mm、溶媒60%メタノール、流速10 mL/min、検出 UV 256 nm）を行い、リテンションタイム3.9分、9.1分、11.6分に3種類のデヒドロ体を得た。機器分析の結果、保持時間9.1分の物質は式(IV)で示されるE-テトラデヒドロ体（CE- $\Delta F\Delta H$ ）であり、11.6分の物質は式(V)で示されるZ-テトラデヒドロ体（CZ- $\Delta F\Delta H$ ）であり、30.1分の物質は式(VI)で示されるデヒドロ体（CF ΔH ）であることがわかった。



式(V)で示される化合物の物理化学データを以下に示す。

EIMS m/z: 280 (M⁺, 100), 107 (36), 279 (29), 281 (18).

UV (MeOH) λ_{max}, nm (ε): 205 (14800), 257 (6500), 351 (27100).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ 6.77, 1H, s

δ 7.02, 1H, s

δ 7.22, 1H, m

δ 7.33, 1H, t (J=7.3)

δ 7.37, 2H, d (J=7.3)

δ 7.43, 2H, dd (J=7.3, 7.3)

δ 7.75, 1H, s

δ 8.09, 1H, s

δ 9.30, 1H, br s

δ 11.91, 1H, s

(実施例3)

各種ジケトピペラジン類を基質とし、本発明の酵素を用いて脱水素反応を行うことにより、各種ジケトピペラジンデヒドロ体の製造を以下のように行った。

表 5

反応液組成

ジメチルスルホキシド (DMSO)	10% (v/v)
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)	5.2 mM
ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP)	80 μM
フェナジンメトサルフェート (PMS)	120 μM
無細胞抽出液 (実施例1にて記述したもの)	適当量
<u>基質</u>	<u>0.5 mM</u>
(計)	0.5 mL

表5に示す組成の反応液を用い、37 °Cで反応を行った。反応生成物はHPLCで分析し、UV吸収 (256 nm) で生成物の検出を行った。以下に、本方法により得られたデヒドロ体を示す。

Δ CAF、 Δ CFF、 Δ CFG、 Δ CFH、 Δ CFL、C Δ FL、CF Δ L、 Δ CFS、 Δ CFV、 Δ CFW、 Δ CLW、 Δ CLY、 Δ CVY、 Δ CWW、 Δ CWY、 Δ CDWY (W残基がD-体) 、 Δ PLH

(実施例4)

各種ジケトピペラジン類を基質とし、本発明の酵素を用いて脱水素反応を行うことにより、各種ジケトピペラジンデヒドロ体の製造を以下のように行った。

表 6

反応液組成

ジメチルスルホキシド (DMSO)	10% (v/v)
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)	5.2 mM
無細胞抽出液 (実施例1にて記述したもの)	適当量
<u>基質</u>	<u>0.5 mg/mL</u>
(計)	0.5 mL

表6に示す組成の反応液を用い、37°Cで反応を行った。反応生成物はHPLCで分析し、フォトダイオードアレイ検出器 (多波長UV, 220 nm~400 nm) で生成物の検出を行った。以下に、本方法により得られたデヒドロ体を示す。ただし、物質名においてD(OMe)はアスパラギン酸の側鎖 (γ 位) のカルボキシル基がメチル化されたものを示し、D(OEt)はアスパラギン酸の側鎖 (γ 位) のカルボキシル基がエチル化されたものを示す。

Δ CAH、 Δ CAW、 Δ CAY、 Δ CD(OMe) D(OMe)、 Δ CDF、 Δ CFG、 Δ CFS、 Δ CFV、 Δ CFW、 Δ CGL、 Δ CGW、 Δ CGY、 Δ CHH、 Δ CHW、 Δ CHY、 Δ CLP、 Δ CLW、 Δ CLY、 Δ CMM、 Δ CSY、 Δ CVW、 Δ CWW、 Δ CWY、 Δ CDWY (W残基がD-体) 、 Δ CD(OEt) G

(実施例5)

各種ジケトピペラジン類を基質とし、本発明の酵素を用いて脱水素反応を行うことにより、各種ジケトピペラジンデヒドロ体の製造を以下のように行った。

反応は実施例3と同様に行い、補酵素に起因する600 nmにおける吸光度変化を測定することにより酵素反応量を求めた。表7に各基質毎の酵素反応量 (吸光度変化、CFLを100とした相対値) を示す。

表 7

各基質の反応量

基質	反応量
CFL	100
CFH	44
CMM	27
CEE	14
CLY	14
CDD	14

(実施例 6)

Streptomyces albulus K023株由来の、ジケトピペラジンを基質とする脱水素酵素の精製を実施例 1 に準じて以下のように行った。

Streptomyces albulus K023株の培養はミニジャーを用いて行い、培地3 Lを用いて167.12 gの菌体を得て、無細胞抽出液を以下のように調製した。

表 8

無細胞抽出液の調製

変換活性 (unit/mL)	蛋白質 (A ₂₈₀) (mg/mL)	比活性 (unit/mg)	液量 (mL)	総活性 (unit)
0.684	14.2	0.0482	382	261.3

同抽出液を以下のようにDEAE-Sephacel陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにかけた。

- ・カラム： DEAE-Sephacel 直径2.6 cm×長さ30 cm
- ・流速： 1 mL/min
- ・フラクションサイズ： 10 mL
- ・サンプル： 無細胞抽出液 113 mL

緩衝液は10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を用い、DTTを0.1 mM加えた。溶出は、サンプル吸着後、緩衝液360 mLでカラムを洗浄し、0.1 MのNaCl入り緩衝液400 mL、0.3 MのNaCl入り緩衝液410 mL、0.5 MのNaCl入り緩衝液600 mLでステップワイズに溶出し、下記の活性フラクションを得た。

表 9

DEAE-Sephacel陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

フラクション	変換活性 (unit/mL)	蛋白質 (A ₂₈₀) (mg/mL)	比活性 (unit/mg)	液量 (mL)	総活性 (unit)
50-56	0.179	1.42	0.126	70	12.5
57-71	0.240	2.56	0.0781	152	30.4

比活性の高いフラクション50-56を次のMono-Qカラムクロマトグラフィーにかけた。

- ・カラム： MonoQ HR 5/5
- ・流速： 1 mL/min
- ・フラクションサイズ： 0.6 mL
- ・サンプル： DEAE-Sephacel フラクション50-56(緩衝液で2倍に希釈) 1mL × 4回

緩衝液は10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を用い、DTTを0.1 mM加えた。溶出は、サンプル吸着後、緩衝液で4分間カラムを洗浄し、1 MのNaCl入り緩衝液で25分かけて直線的な濃度勾配をかけて溶出した。4回分のカラムクロマトグラフィーで得られた活性画分は以下のとおりであった。

表 10

MonoQ陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

変換活性 (unit/mL)	蛋白質 (A ₂₈₀) (mg/mL)	比活性 (unit/mg)	液量 (mL)	総活性 (unit)
0.0201	0.0376	0.646	7.2	0.145

前記活性画分を、以下のようにゲルfiltrationクロマトグラフィー (Superose 12) にかけた。

- ・カラム： Superose 12 HR 10/30
- ・流速： 0.5 mL/min
- ・フラクションサイズ： 0.25 mL
- ・サンプル： MonoQ活性フラクション (濃縮 225 μL)

緩衝液は10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を用い、DTTを0.1 mM、NaClを0.3 M加えた。各フラクションにおける活性を表11に示す。最も活性の高いフラクション13-16をまとめ、限外濾過で濃縮した。

表 11

Superose 12ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製

フラクション	変換活性 (unit/mL)	液量 (μL)	総活性 (unit)
11, 12	0.0737	100	7.37
13, 14	0.253	45	11.4
15, 16	0.184	45	8.28
17, 18	0.0526	80	4.21

前記活性画分を、以下のように更にWaters LC Module1を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (TSK G3000SWXL) にかけた。

- ・カラム： TSK GEL G3000SWXL
- ・流速： 0.5 mL/min
- ・サンプル： Superose活性フラクション(濃縮) 40 μL

緩衝液は100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を用い、DTTを0.1 mM、NaClを0.3 M加えた。活性画分をまとめ、限外濾過で濃縮したものの活性等を表12に示す。

表 12

TSK G3000SWXLゲル濾過クロマトグラフィーによる精製

活性 (unit)	蛋白質 (A ₂₈₀) (mg/mL)	比活性 (unit/mg)
0.00224	0.00114	19.6

以下に、本精製の各ステップにおける活性と最終的な活性を表13に示す。

表 13

酵素精製と比活性

精製ステップ	酵素活性 (unit)	蛋白質 (mg)	比活性 (unit/mg)
無細胞抽出液	0.734	15.2	0.0482
DEAE-Sephadex	0.119	0.946	0.126
Mono-Q	0.0644	0.120	0.537
Superose 12	0.00790	0.00799	0.989
TSK G3000SW	0.00224	0.000114	19.6

(実施例 7)

各種ジケトピペラジン類を基質とし、本発明の酵素を用いて、表 14 に示す反応液組成で酵素反応を行った。得られた酵素反応液について、反応生成物を精製することなく反応液のままでサンショウウニの胚分裂阻害活性測定試験を行った。測定方法は、The Journal of Antibiotics, Vol. 52, p. 1017, 1999記載の方法に従った。ただし、ウニの種類により、第一卵割の時期が異なるため、サンショウウニを用いた本試験においては、受精 1 時間後に卵割阻害を観察した。また、反応生成物を精製していないので、阻害剤濃度として、酵素反応系中に加えた基質濃度を基準とした。基質濃度相当で、25 μg/mL を最高濃度とし、以下段階的に希釈をしてサンショウウニの胚分裂阻害活性測定試験を行った結果を表 15 に示す。

表 14

反応液組成

ジメチルスルホキシド (DMSO)	10% (v/v)
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)	5.2 mM
無細胞抽出液 (実施例 1 にて記述したもの)	適当量
<u>基質</u>	<u>0.5 mg/mL</u>
(計)	0.2 mL

表 15

(酵素反応液の卵割阻害活性試験結果)

	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
CDF 反応物	>25 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で80%阻害)
CFF 反応物	>25 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で90%阻害)
CFV 反応物	25
CGL 反応物	>13 (13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で70%阻害)
CHW 反応物	13
CLY 反応物	>13 (13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で60%阻害)
CWY 反応物	6.3

(実施例 8)

各種脱水素型ジケトピペラジン類の生理活性について以下に述べる。細胞分裂阻害活性として、バフンウニ、ハスノハカシパン及びサンショウウニを用い、それぞれに対する卵割阻害活性（細胞分裂阻害活性）を測定した。測定方法はThe Journal of Antibiotics, Vol. 52, p. 1017, 1999記載の方法に従った。ただし、ウニの種類により、第一卵割の時期が異なるため、バフンウニ、ハスノハカシパンを用いた試験においては受精4時間後に、また、サンショウウニを用いた試験においては、受精1時間後に卵割阻害を観察した。その結果を表16に示す。

表 16

デヒドロフェニラヒスチントその関連化合物の細胞分裂阻害試験結果

化合物名	MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$		
	ハスノハカシパン	サンショウウニ	バフンウニ
実施例1 デヒドロフェニラヒスチント	0.0061	0.0061	0.00038
実施例2 (Z, Z)-Tetrahydro-CFH	1.6	1.6	0.78
比較例1 (-)-フェニラヒスチント	1.6	0.2	0.39
比較例2 (+)-フェニラヒスチント	>13*	6.3	13
比較例3 albonoursin	>13*	>25*	6.3
比較例4 CFH	>25*	>25*	>25*

* この濃度で活性なし

デヒドロフェニラヒスチントのハスノハカシパン、サンショウウニの細胞分裂に

に対するMICは、いずれも、 $0.0061\mu\text{g/mL}$ 、バフンウニの細胞分裂に対するMICは、 $0.00038\mu\text{g/mL}$ であり、脱水素化されていない(-)-フェニラヒスチンと比べると250倍から1000倍の阻害活性を示した。また、CFHを脱水素化することによって得られた(Z, Z)-tetrahydro-CFHは、CFHの15倍以上の阻害活性を示した。いずれにしても、デヒドロフェニラヒスチンや(Z, Z)-tetrahydro-CFHをはじめとする種々のデヒドロジケトピペラジン類に細胞分裂阻害効果が見られたことは、デヒドロジケトピペラジン類が細胞分裂阻害剤及び抗腫瘍剤として有用であることを示している。

(製剤例1) 注射・点滴剤

デヒドロフェニラヒスチン1 mgを含有するように、粉末ブドウ糖5 gを加えてバイアルに無菌的に分配し密封した上、窒素、ヘリウム等の不活性ガスを封入して冷暗所に保存した。使用前にエタノールに溶解し、0.85%生理食塩水100 mLを添加して静脈内注射剤とし、1日10～100 mLを症状に応じて静脈内注射又は点滴で投与する。

(製剤例2) 注射・点滴剤

デヒドロフェニラヒスチン0.2 mgを用いて、製剤例1と同様の方法により軽症用静脈内注射剤とし、1日10～100 mLを症状に応じて静脈内注射又は点滴で投与する。

(製剤例3) 顆粒剤

デヒドロフェニラヒスチン100 mg、乳糖98 g及びヒドロキシプロピルセルロース1 gを各々とり、よく混合した後、常法に従って粒状に成形し、これをよく乾燥して篩別してピン、ヒートシール包装等に適した顆粒剤を製造した。1日100～1000 mgを症状に応じて経口投与する。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

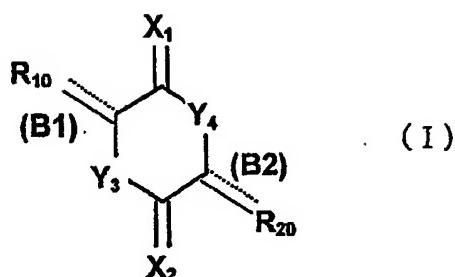
産業上の利用の可能性

本発明により、強力な細胞周期阻害活性、特に抗腫瘍活性を有する細胞分裂阻

害剤、及びその製造に使用可能な酵素が提供される。

請求の範囲

1. 次式(I) :



[式中、 X_1 及び X_2 は、それぞれ独立に酸素原子又は硫黄原子を表し、
 Y_3 は酸素原子、硫黄原子、 $-NR_3-$ 又は $-CR_{31}R_{32}-$ を表し、
 Y_4 は酸素原子、硫黄原子、 $-NR_4-$ 又は $-CR_{41}R_{42}-$ を表し、
 R_{10} はハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐してもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、
 R_{20} はハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐してもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、
 R_3 及び R_4 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐してもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、
 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{41} 及び R_{42} は、それぞれ独立に、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、 C_{1-25} アルキル基、 C_{2-25} アルケニル基、 C_{2-25} アルキニル基、 C_{1-25} アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐してもよく、]

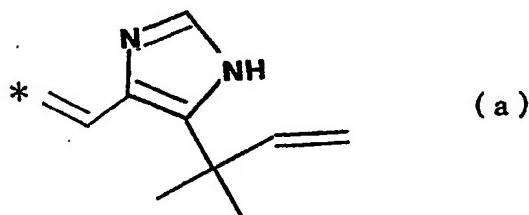
環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R_{10} と R_3 、 R_{31} 、 R_{32} のいずれかとは環を形成していてもよく、

R_{20} と R_4 、 R_{41} 及び R_{42} のいずれかとは環を形成していてもよく、

(B1) 及び (B2) は、それぞれ独立に炭素-炭素一重結合又は炭素-炭素二重結合を表し、少なくとも一方は炭素-炭素二重結合であり、その立体配置はE, Zのいずれでもよく、

前記の基の少なくとも1つは、生体において分解可能な保護基を有していてもよい。但し、 X_1 及び X_2 が共に酸素原子で、 Y_3 及び Y_4 が共に- $NH-$ で、 R_{10} がベンジル基で、(B1) 及び (B2) が共に炭素-炭素二重結合であり、かつ、 R_{20} がイソブチル基又はベンジル基である場合、並びに X_1 及び X_2 が共に酸素原子で、 Y_3 及び Y_4 が共に- $NH-$ で、 R_{10} がベンジル基で、(B1) が炭素-炭素一重結合で、(B2) が炭素-炭素Z-二重結合であり、かつ、 R_{20} が次式(a)：



(式中、*は結合位置を表す。)

で示される基である場合を除く。]

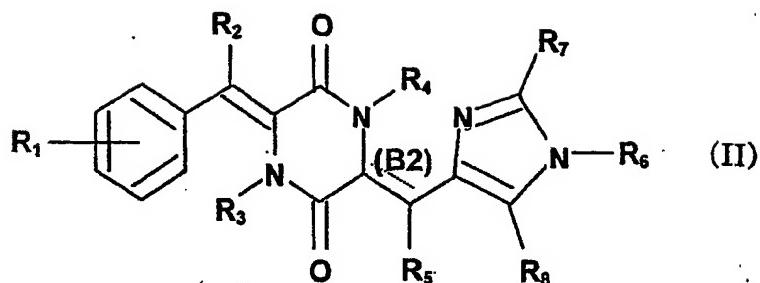
で示される化合物又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有する細胞分裂阻害剤。

2. 前記式(I)において、(B1)及び(B2)が共に炭素-炭素二重結合である請求の範囲第1項記載の細胞分裂阻害剤。

3. 前記式(I)において、 X_1 及び X_2 が共に酸素原子で、 Y_3 が- NR_3- 、 Y_4 が- NR_4- である請求の範囲第1項又は第2項記載の細胞分裂阻害剤。

4. 前記式(I)において、 Y_3 及び Y_4 は共に- $NH-$ である請求の範囲第3項記載の細胞分裂阻害剤。

5. 次式(II)：



(式中、R₁は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、R₁は1個でも、同一又は異なる5以下の複数個でもよく、互いに環を形成してもよく、

R₂は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₃及びR₄は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₅は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₆は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリ

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 9-11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページに記載

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

ール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₇及びR₈は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₂とR₃とは環を形成していてもよく、

R₄とR₅、R₆、R₇及びR₈のいずれかとは環を形成していてもよく、

(B2)は炭素ー炭素一重結合又は炭素ー炭素二重結合を表し、

前記の基の少なくとも1つは、生体において分解可能な保護基を有していてよい。)

もしくはこのE体で示される化合物又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有する細胞分裂阻害剤。

6. 前記式 (II)において、(B2)が炭素ー炭素二重結合である請求の範囲第5項記載の細胞分裂阻害剤。

7. 前記式 (II)において、R₇及びR₈の少なくとも一方が1, 1-ジメチル-2-プロペニル基である請求の範囲第6項記載の細胞分裂阻害剤。

8. 抗腫瘍剤である請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の細胞分裂阻害剤。

9. 前記式 (I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素ー炭素一重結合である化合物、又は前記式 (II)における (B2)が炭素ー炭素一重結合である化合物の当該炭素ー炭素一重結合を炭素ー炭素二重結合に変換する活性を有する脱水素酵素。

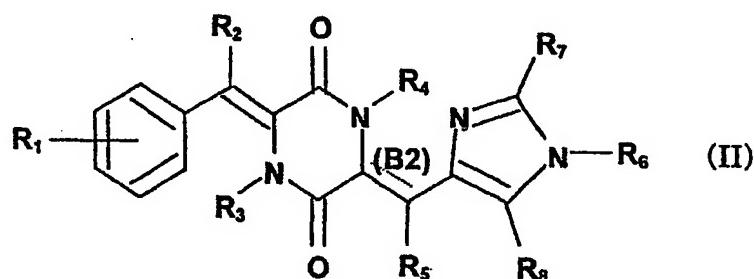
10. 分子量が700 kDaから800 kDaである請求の範囲第9項記載の脱水素酵素。

11. *Streptomyces albulus*が生産する請求の範囲第9項又は第10項記載の酵素。

12. 前記式(I)における(B1)及び(B2)の少なくとも一方が炭素-炭素一重結合である化合物、又は前記式(II)における(B2)が炭素-炭素一重結合である化合物を基質として用い、範囲第9項～第11項のいずれか1項に記載の脱水素酵素を含む細胞、無細胞抽出液又は酵素液を用いて、当該炭素-炭素一重結合を炭素-炭素二重結合に変換することを含む請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の細胞分裂阻害剤の製造方法。

13. 請求の範囲第11項記載の脱水素酵素を用いた請求の範囲第12項記載の方法。

14. 次式(II)：



(式中、R₁は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、R₁は1個でも、同一又は異なる5以下の複数個でもよく、互いに環を形成してもよく、

R₂は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₃及びR₄は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換さ

れでいてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₅は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₆は水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₇及びR₈は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、C₁₋₂₅アルキル基、C₂₋₂₅アルケニル基、C₂₋₂₅アルキニル基、C₁₋₂₅アルコキシ基、アラルキル基、水酸基、アミノ基、ニトロ基又はアリール基を表し、これらの基は他の置換基により置換されていてもよく、炭素鎖の一部は分岐していてもよく、環状であってもよく、ヘテロ原子を含んでいてもよく、

R₂とR₃とは環を形成していてもよく、

R₄とR₅、R₆、R₇及びR₈のいずれかとは環を形成していてもよく、

(B2)は炭素-炭素一重結合又は炭素-炭素二重結合を表し、

前記の基の少なくとも1つは、生体において分解可能な保護基を有していてよい。)

もしくはこのE体で示される化合物又はその薬学的に許容される塩。

不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述 | 開示の日 1999年10月2日 (02.10.99)
開示の場所 平成11年度 中部支部・関西支部合同
大会およびシンポジウム
Joint conference of Chubu/Kansai
branch offices symposium
開示の種類 学会発表
Presentation at the Institute's
Meeting
学会の名称 日本農芸化学会
Japan society for bioscience,
biotechnology, and agrochemistry

開示の日 1999年11月 (November, 1999)
開示の場所 Japan antibiotics research
association
開示の種類 刊行物
Publication
刊行物の名称 The journal of antibiotics
vol. 52 No. 11 (1017-1022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07D403/06, A61K31/496, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D403/06, A61K31/496, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)
REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-130266, A (Nippon Steel Corporation), 19 May, 1998 (19.05.98), Full text (Family: none)	1-14
A	US, 5607934, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 March, 1997 (04.03.97), Full text & JP, 7-25858, A Full text & WO, 95/2593, A1 & EP, 659182, A & AU, 9470832, A & CN, 1112364, A	1-14
X	Hiroshi Kanzaki, Daisuke Imura, Reiko Sashida, Akiko Kobayashi, Kazuyoshi Kawazu, "Effective Production of Dehydro Cyclic Dipeptide Albonoursin Exhibiting Pronuclear Fusion Inhibitory Activity" The Journal of Antibiotics (1999), Vol. 52, No. 11, pp. 1017-1022	9-11
X	Hiroshi KANZAKI et al., "Housenkin no Kouso ni yoru Kanjou Dipeptide rui kara Datsu Suiso gata Kanjou Dipeptide e no Biseibutsu Henkan"	9-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 November, 2000 (29.11.00)Date of mailing of the international search report
12 December, 2000 (12.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06807

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nippon Nougei Kagakukai Kansai Shibu Taikai oyobi Symposium Youshishuu (1999), p. 48 Hiroshi KANZAKI et al., "Shinki no Kanjou Dipeptide Datsu Suiso Kouso to sono Kassei Sokutei hou no Kakuritsu" Okayama Daigaku, Nougakubu, Gakujutsu Houkoku (1999), Vol. 88, pp. 7-11	9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06807

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 9-11
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06807**Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet (1)**

Although the inventions as set forth in claims 9 to 11 pertain to dehydrogenases, it is merely stated in the specification that these enzymes may originate in any organisms such as *Streptomyces albulus*. Since enzymes have substrate specificity, the particular scope of the enzymes cannot be specified, other than those particularly cited in the description, though the common general technical knowledge on the filing day is taken into consideration. Thus, no meaningful international search can be performed thereon.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C07D403/06, A61K31/496, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C07D403/06, A61K31/496, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CA (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-130266, A (新日本製鐵株式会社) 19. 5月. 1998 (19. 05. 98), 全文 (ファミリーなし)	1-14
A	US, 5607934, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) 4. 3月. 1997 (04. 03. 97), 全文 & JP, 7-25858, A, 全文 & WO, 95/2593, A1 & EP, 659182, A & AU, 9470832, A & CN, 1112364, A	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 11. 00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

内田 淳子

4P

2939

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Hiroshi Kanzaki, Daisuke Imura, Reiko Sashida, Akiko Kobayashi, Kazuyoshi Kawazu "Effective Production of Dehydro Cyclic Dipeptide Albonoursin Exhibiting Pronuclear Fusion Inhibitory Activity" The Journal of Antibiotics (1999), Vol. 52, No. 11, p. 1017-1022	9-11
X	神崎浩、柳沢恵広、赤沢和美、仁戸田照彦「放線菌の酵素による環状ジペプチド類から脱水素型環状ジペプチド類への微生物変換」日本農芸化学会関西支部大会およびシンポジウム要旨集(1999), p. 48	9-11
X	神崎浩、赤沢和美、井村大輔、仁戸田照彦「新規の環状ジペプチド脱水素酵素とその活性測定法の確立」岡山大学農学部学術報告(1999), Vol. 88, p. 7-11	9-11

第I欄2の続き

請求の範囲9-11は脱水素酵素に関する発明であるが、明細書中には*Streptomyces albus*由来のもの等、如何なる生物から得られたものでもよい旨が記載されているのみである。酵素は基質特異性を有するため、該酵素については、出願時の技術常識を勘案しても明細書に具体的に記載されているものを除いては、その示す具体的な範囲を特定することができないため、有意義な国際調査を行うことができない。

は環状のいずれでもよく、例えばビニル、プロペニル、1, 1-ジメチル-2-プロペニル、3-メチル-3-ブテニル基が挙げられ、好ましくはC₂₋₁₀アルケニルであり、更に好ましくはC₂₋₆アルケニルである。これらのアルケニル基は他の置換基により置換されていてもよく、ハロゲン、酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい。

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₁₀、R₂₀、R₃₁、R₃₂、R₄₁又はR₄₂で表されるC₂₋₂₅アルキニル基は、炭素原子2～25を有するアルキニル基であり、直鎖状、分枝状又は環状のいずれでもよく、例えばエチニル、プロピニル、ブチニルが挙げられ、好ましくはC₂₋₁₀アルキニルであり、更に好ましくはC₂₋₆アルキニルである。これらのアルキニル基は他の置換基により置換されていてもよく、ハロゲン、酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい。

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₁₀、R₂₀、R₃₁、R₃₂、R₄₁又はR₄₂で表されるC₁₋₂₅アルコキシ基は、炭素原子1～25を有するアルコキシ基であり、直鎖状、分枝状又は環状のいずれでもよく、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、シクロペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、シクロヘキシルオキシ、ヘプチルオキシ、5-メチルヘキシルオキシ、シクロヘプチルオキシ、オクチル、6-メチルヘプチルオキシ、ノニルオキシ、7-メチルオクチルオキシ、デシルオキシ、8-メチルノニルオキシが挙げられ、好ましくはC₁₋₁₀アルコキシであり、更に好ましくはC₁₋₆アルコキシである。これらのアルコキシ基は他の置換基により置換されていてもよく、ハロゲン、酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい。

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₁₀、R₂₀、R₃₁、R₃₂、R₄₁又はR₄₂で表されるアリール基は、単環又は多環の芳香族炭化水素基であり、例えばフェニル、ナフチル、アントラニルが挙げられ、好ましくはフェニルである。これらのアリール基は他の置換基、例えばC₁₋₆アルキル（好ましくはメチル、エチル、プロピル）、C₁₋₆アルコキシ、ハロゲン、ニトロ、アミノ、カルボキシル、ヒドロキシ-C₁₋₆アルキル、ヒドロキシ、保護されたヒドロキシにより置換されていてもよく、環員として酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子を含んでいてもよい。

THIS PAGE BLANK (USPTO)